



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	甲第1812号
学位記番号	第1290号
氏名	大見 関
授与年月日	令和3年3月24日
学位論文の題名	<p>Escin inhibits angiogenesis by suppressing interleukin-8 and vascular endothelial growth factor production by blocking nuclear factor-κB activation in pancreatic cancer cell lines (エスシンはNF-κBの阻害を介してIL-8およびVEGFの産生を抑制することで膵癌の血管新生を阻害する)</p> <p>Oncology Report, in press.</p>
論文審査担当者	<p>主査： 片岡 洋望 副査： 大原 弘隆, 高橋 智</p>

【背景】膵癌は悪性度が極めて高い癌であり、集学的治療の進歩によりその予後は徐々に改善しているが未だ十分ではなく、より効果のある新規治療薬の開発は急務である。我々は今までに、膵癌の転移や血管新生に転写因子 NF- κ B が重要な役割を果たしていることを解明してきた。実際に、転移能の高い膵癌は恒常的に NF- κ B の活性が高く、その下流の VEGF や IL-8 といった血管新生因子の産生能を亢進し悪性度を高めている。以上より、NF- κ B は新規分子標的薬のターゲットになると考えられるが、既存の NF- κ B 阻害薬は副作用が強く長期投与が困難なことから、膵癌では臨床応用に至っていない。そこで、副作用が少ないとされる天然由来の化合物、すなわちナチュラルプロダクトに着目した。エスシンは西洋トチノキの種子由来のサポニンで、様々な癌種において細胞増殖や NF- κ B 活性を抑えることで抗腫瘍効果を示すことが報告されているが、膵癌の血管新生におけるエスシンの効果は未だ明らかではない。今回我々は、エスシンが膵癌の NF- κ B 活性を抑制し、血管新生能が低下するかを検討した。

【方法】WST-1 assay を用いて複数の膵癌細胞株 (BxPC-3、SW 1990、AsPC-1) におけるエスシンの細胞増殖能に対する効果を検討した。免疫染色および NF- κ B ELISA を用いて TNF- α により誘導される NF- κ B の核内移行に対するエスシンの作用を検討した。Western blotting では NF- κ B およびリン酸化 NF- κ B の細胞内での変化について TNF- α 刺激下とエスシン投与下において検討した。次いで、膵癌細胞株において、TNF- α 刺激により誘導された IL-8 および VEGF の各 mRNA 発現量の変化を RT-PCR にて確認した。また、エスシン投与による各膵癌細胞株の IL-8、VEGF タンパクの産生量の変化および、TNF- α 刺激により増加した IL-8 および VEGF タンパクの産生量がエスシンの投与によって変化することを ELISA で定量した。On matrigel tube formation assay で、エスシンを投与した各膵癌細胞株の細胞上清を用いて不死化ヒト内皮細胞の管腔形成能に対するエスシンの効果を検討した。

【結果】エスシンは 20 μ M 以上の濃度において細胞増殖を抑制した。またエスシンは、NF- κ B の細胞質から核内への移行を抑制し、実際にその活性が低下することを NF- κ B ELISA で定量的に確認した。Western blotting では、エスシンの投与によって細胞質、核内それぞれで total NF- κ B だけでなく、リン酸化 NF- κ B の活性が低下していることが示唆された。さらに RT-PCR と ELISA では、エスシンの投与により IL-8 や VEGF といった血管新生因子の遺伝子発現とタンパク産生量が低下することを示した。エスシンの投与は、不死化ヒト内皮細胞の管腔形成能を低下させた。

【結語】エスシンは膵癌細胞の血管新生能を低下し新たな分子標的薬となる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

【背景】膵癌は悪性度が極めて高く、より効果のある新規治療薬の開発は急務である。消化器外科学教室ではこれまでに、膵癌の転移や血管新生に転写因子 NF- κ B が重要な役割を果たしていることを報告してきた。転移能の高い膵癌は恒常的に NF- κ B の活性が高く、その下流の VEGF や IL-8 といった血管新生因子の産生能を亢進し悪性度を高めている。以上より、NF- κ B は新規分子標的薬のターゲットになりうるが、既存の NF- κ B 阻害薬は膵癌では臨床応用に至っていない。今回の研究では天然由来の化合物に着目した。エスシンは西洋トチノキの種子由来のサポニンで、様々な癌種において細胞増殖や NF- κ B 活性を抑えることで抗腫瘍効果を示すことが報告されているが、膵癌の血管新生におけるエスシンの効果は未だ明らかではない。

【目的】エスシンが膵癌の NF- κ B 活性を抑制し、血管新生能が低下するかを検討する。

【方法】WST-1 assay を用いて複数の膵癌細胞株 (BxPC-3、SW 1990、AsPC-1) におけるエスシンの細胞増殖能に対する効果を検討した。免疫染色および NF- κ B ELISA を用いて TNF- α により誘導される NF- κ B の核内移行に対するエスシンの作用を検討した。Western blotting では NF- κ B およびリン酸化 NF- κ B の細胞内での変化について TNF- α 刺激下とエスシン投与下において検討した。次いで、膵癌細胞株において、TNF- α 刺激により誘導された IL-8 および VEGF の各 mRNA 発現量の変化を RT-PCR にて確認した。また、エスシン投与による各膵癌細胞株の IL-8、VEGF タンパクの産生量の変化および、TNF- α 刺激により増加した IL-8 および VEGF タンパクの産生量がエスシンの投与によって変化することを ELISA で定量した。Matrigel tube formation assay で、エスシンを投与した各膵癌細胞株の細胞上清を用いて不死化ヒト内皮細胞の管腔形成能に対するエスシンの効果を検討した。

【結果】エスシンは 20 μ M 以上の濃度において細胞増殖を抑制した。またエスシンは、NF- κ B の細胞質から核内への移行を抑制し、実際にその活性が低下することを NF- κ B ELISA で定量的に確認した。Western blotting では、エスシンの投与によって細胞質、核内それぞれで total NF- κ B だけでなく、リン酸化 NF- κ B の活性が低下していることが示唆された。さらに RT-PCR と ELISA では、エスシンの投与により IL-8 や VEGF といった血管新生因子の遺伝子発現とタンパク産生量が低下することを示した。エスシンの投与は、不死化ヒト内皮細胞の管腔形成能を低下させた。

【結語】エスシンは膵癌細胞の血管新生能を低下し新たな分子標的薬となる可能性が示唆された。

【審査内容】主査の片岡洋望教授からは①NF- κ B Assay kit の原理について、②エスシンが NF- κ B の経路のどこを抑制するか、③エスシンの臨床応用について、④新規膵癌化学療法薬の薬剤について、など計 6 項目の質問があった。第 1 副査の大原弘隆教授からは①エスシンに着目した理由、②内皮細胞の管腔形成能が転移能を示しているのか、③EA.hy926 細胞の性質について、など計 6 項目の質問がなされた。第 2 副査の高橋智教授からは①エスシンの過去の疫学報告について、②すでに核内移行した NF- κ B をエスシンで細胞質内に戻すことができるか、③天然化合物の安全性について、計 9 項目の質問がなされた。

これらの質問に対し、一部返答に窮することもあったが、おおむね満足すべき回答が得られ、学位論文の主旨を十分理解していると判断した。本研究は、天然化合物エスシンの膵癌に対する抗血管新生作用について的一端を解明し、今後の発展も期待できると考えられた。よって、これら新知見を理解し報告した本論文の筆頭著者は博士 (医学) の学位を授与するに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 片岡洋望 教授 副査 大原弘隆 教授、高橋 智 教授